

应用纳米与分子探针技术对 IgG 抗原水平的检测

周波,王海燕,楼莎,刘珍宝,朱敦皖,冷希岗

中国医学科学院·中国协和医科大学生物医学工程研究所,天津 300192

摘要 人们研究并逐步认识了纳米金与 DNA 等相互作用的特性和条件,并对以纳米金为基础发展起来的生物条码技术进行了更加深入的研究与应用。基于纳米金的生物条码及其相关技术研究与应用日益广泛,并不断有创新,本研究应用纳米技术并结合分子探针技术对低浓度的抗原水平进行检测。该生物条码技术常被用于检测某些蛋白、核酸、细胞或细胞因子的水平,并由此形成了不同于 PCR、ELISA 但仍具有高灵敏度特性的检测方法。通过磁性微球标记单抗以捕获、富集待测抗原,修饰多抗与亲和素的纳米金并结合分子信标探针起到信号扩增的作用。通过二硫键(—S—S—)分子信标探针茎部 3' 端的碱基 T 连接一生物素分子。待测抗原可将磁珠与纳米金系统进行连接,然后应用二巯苏糖醇(DTT)将连接于纳米金上的 MB 切割下来,并与其环部完全互补配对的靶序列杂交后测定荧光强度。荧光强度与待测抗原水平(含量)相关。

关键词 纳米技术;分子探针;磁性微球;纳米金;分子信标;IgG 抗原;亲和素;生物素

中图分类号 Q331, R331

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)21-0038-06

Detection of the Antigen IgG Microconcentration with Nanotechnology and Molecular Probes Technology

ZHOU Bo, WANG Haiyan, LOU Sha, LIU Zhenbao, ZHU Dunwan, LENG Xigang

Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Abstract With better understanding of the characteristics and conditions of the interaction between the gold nanoparticles and DNA, people are developing the bio-bar-code growth technology based on the gold nanoparticles. The method is widely applied to detect the level or microconcentration of some proteins, nucleic acid, cells and cytokines. New methods are coming into being with higher sensitivity as distinct from the PCR and ELISA. The bio-

bar-code and the related technology based upon the gold nanoparticles are being continuously innovated. In this paper, the microconcentration of the antigen IgG is detected by applying nanotechnology and molecular probes technology in the experiment. The magnetic microbeads modified with the monoclonal antibody are used to capture the target antigen IgG, to modify the gold nanoparticles with the polyclonal antibody and the avidin combined with the molecular beacons, thus to modify the biotin through the disulfide bonds at the T base position of the 3' terminal of the stem, and to amplify the signal in cascades. The magnetic microbeads can be combined with the gold nanoparticles through the detected antigen IgG. Then the DTT could cut the MB off the gold nanoparticles through the reduction effect and the free MB can be hybridized with its target sequence. Then the fluorescence density is measured with Spectrofluorometer. The results show that there are some relationships between the fluorescence density and the concentration of the antigen IgG. The detection sensitivity of the research is very high, which reaches 1pg/ml, about the 6.67 fM.

Keywords nanotechnology; molecular probes; magnetic microbeads; gold nanoparticles; molecular beacons; antigen IgG; avidin; biotin

收稿日期: 2009-09-14

基金项目: 科技部社会公益项目(2005DIB1J094)

作者简介: 周波, 博士研究生, 研究方向为肿瘤分子生物学, 电子信箱: wavecyc@yahoo.cn; 冷希岗(通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: M083000246S), 研究员, 研究方向为纳米生物医学技术和生物技术药物, 电子信箱: lengxgky@163.com

0 引言

纳米技术已广泛应用于生命科学领域,有力地推动了生物医药理论与技术的发展和进步。同时,分子探针技术目前已被广泛应用,其与现已发展起来的生物条码技术都具有较高的灵敏度^[1-13]。纳米技术在生命科学尤其是在医学应用领域展示了其优势与特点,应用范围包括疾病诊断、载体治疗、反义与基因治疗即人工器官与移植等^[14]。分子信标(Molecular Beacons, MB)最先由 Tyagi^[15]发明,其后被广泛应用。MB 在 DNA 和 RNA 研究领域是应用非常广泛的分子探针。诸如 DNA 与 DNA 杂交、基因分型、等位基因的鉴定、DNA 与 RNA 杂交及生物传感器等方面都有应用^[16-23]。MB 已在生命科学研究领域成为一重要的应用和诊断工具^[24]。

本实验的目的是应用分子信标探针结合磁性微球和纳米金,对 IgG 抗原水平进行检测。探讨该种检测方法的可行性与有效性,及其影响检测灵敏度的可能因素与条件。主要

目的是为了探索一条有效的并具高灵敏度的技术路线和方法,以期应用到基础研究与医学检验之中。

1 材料和方法

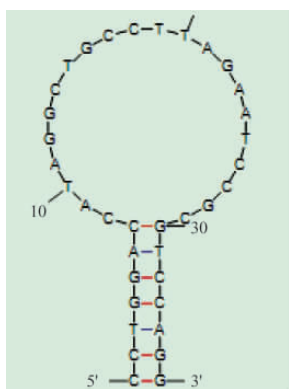
1.1 实验用试剂

柠檬酸钠、HAuCl₄、亲和素、生物素、IgG 抗原、IgG 单抗(鼠抗人)、IgG 多抗(羊抗人)、磷酸盐溶液(PB),分子信标及其靶序列的设计与合成^[25]。

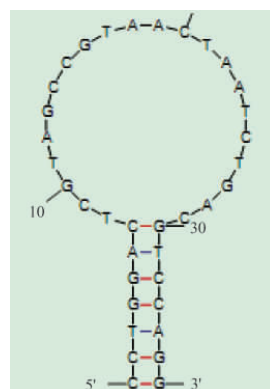
根据实验要求设计分子信标(MB1、MB2)及其靶序列(target sequence1, target sequence2)。分子信标结构如图 1 所示。同时列出 MB1、MB2 的融解温度(melting temperature, T_m)值及其热力与动力学指数。2 个 MB 茎部碱基序列相同,环部碱基序列相异(即靶序列不同)。

分子信标及其靶序列由 TaKaRa 合成(HPLC 纯化)。

通过二硫键标记生物素的 MB1/MB2,见图 2。



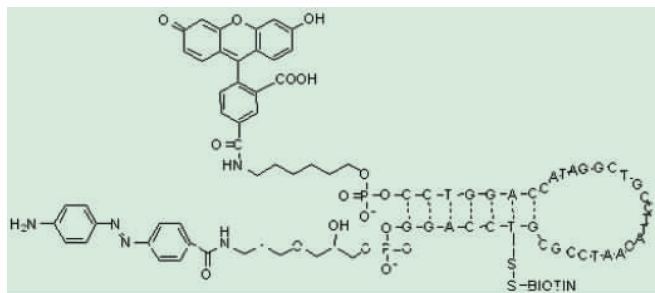
MB1: $\Delta G = -3.5$ kcal/mol, $\Delta H = -50.3$ kcal/mol, $\Delta S = -150.9$ eu, $T_m = 60.1^\circ\text{C}$,
靶序列为 3'-GTATCCGACGGAATCTTAGGCG 5'



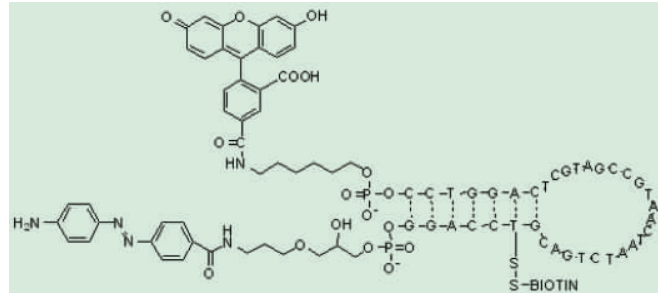
MB2: $\Delta G = -3.6$ kcal/mol, $\Delta H = -52.0$ kcal/mol, $\Delta S = -156.1$ eu, $T_m = 60.0^\circ\text{C}$,
靶序列为 3'-AGCATCGGCATTGATTAGACTG 5'

图 1 分子信标结构

Fig. 1 Image of MB1 and MB2



(a) MB1



(b) MB2

图 2 通过二硫键标记生物素的 MB1 和 MB2 示意

Fig. 2 Images of MB1 and MB2 labeled with the biotin through the disulfide bonds

1.2 纳米金制备与修饰

1.2.1 纳米金制备

通过柠檬酸钠还原法制备纳米金颗粒^[26]。取 0.1 mg/mL 的 HAuCl₄ 溶液 30 mL 加热回流,后迅速加入浓度(质量体积比浓度)为 1% 的柠檬酸钠溶液 600 μL ,继续加热回流,强力

搅拌约 30 min,待溶液变为棕红色后停止加热,自然冷却即得到纳米金胶体溶液。

1.2.2 纳米金修饰

1.2.2.1 亲和素/IgG 多抗标记纳米金颗粒

采用物理吸附法应用亲和素(Avidin)修饰纳米金。取 0.1

mg/mL 的纳米金溶液 1 mL, 加入 1 mg/mL 的 Avidin 溶液 100 μ L, 充分振荡后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 反应 12 h, 高速离心 (15 000 r/min) 后除去未吸附的 Avidin, 再加入缓冲溶液稀释即得到修饰 Avidin 的纳米金。

抗体 (IgG 多抗-羊抗人) 修饰纳米金颗粒制备方法同上。

1.2.2.2 磁球修饰/IgG 单抗修饰磁球

取 100 μ L 磁球 (0.1 mg/mL), 磁性微球: 胺基磁球 (2~3 μ m, 胺基含量为 0.6 mmol/g), C3-间隔臂/C7-间隔臂 (天津市倍思乐色谱技术开发中心), 加入 3 000 μ L PB (pH=7.4, 0.05 mol/L), 磁性分离。去除上清, 加入 0.2 μ g/ μ L IgG 单抗 (鼠抗人)、0.2 μ g/ μ L EDC (内含 NHS 0.1 μ g/ μ L) 100 μ L, 混悬 3 h。磁性分离, 再用 300 μ L PB 洗涤, 重复 3 次备用。

1.2.3 修饰生物素的分子信标与修饰后纳米金及磁球连接

MB1/MB2 的用量为 20 pmol, 与之杂交的靶序列的用量为 200 pmol。MB1/MB2 与修饰后纳米金混合, 使分子信标与纳米金体系相连, 然后再加入磁球系统, 形成由磁球·单抗·IgG 抗原·多抗·纳米金·亲和素·生物素·分子信标等组成的一个巨大的体系。

1.2.4 二硫苏糖醇切割巯基分离分子信标与纳米金

将二硫苏糖醇加入通过待测 IgG 抗原所连接起来的磁性微球与纳米金体系中, 通过二硫苏糖醇对连接分子信标与生物素之间的二硫键的还原作用, 将分子信标从上述体系中游离出来进行杂交, 测定荧光强度。作用时间在 12 h 以上。解离的分子信标中加入足量靶序列 (一般 10 倍量于 MB) 杂交后测定荧光强度 (预实验已证实靶序列的用量 10 倍于分子信标用量杂交时的荧光强度值已处于平台期)。

1.3 实验分组

实验分为空白与实验对照组及杂交实验组。不含 IgG 抗原为空白对照组; 含 IgG 抗原不加入 MB 靶序列为实验对照组; 含 IgG 抗原并加入 MB 靶序列进行杂交为杂交实验组。选取 3 个 IgG 抗原浓度, 各相差 2 个数量级。为确定分子信标的特异性, 选择 2 个分子信标 MB1/MB2 进行平行实验。IgG 抗原浓度分别为 1、100、10 000 pg/mL。

1.4 仪器测定

应用透射电镜 (TEM) 测定纳米金的平均粒径与分散度。用原子力显微镜 (AFM) 对纳米金和修饰后的纳米金形态进行观察。荧光分光光度计用于测定 MB 与靶序列杂交后的荧光强度。

2 结果与讨论

2.1 TEM 检测结果

TEM 显示柠檬酸钠还原法制备的纳米金粒径介于 10~15 nm (图 3), 同时分散度良好, 对于进行其他修饰是一个良好的基础。适宜的离子浓度及温度对于纳米金保持良好的分散度, 减少聚集也是一个重要的条件^[1]。纳米金所处的溶液环境中电解质浓度过高, 就会引起纳米金的聚集^[27]。这是由于溶液中残留的阴离子在纳米金周围形成负电荷与纳米金颗粒之间的聚合

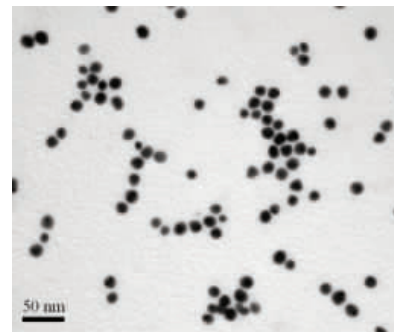


图 3 柠檬酸钠还原法制备纳米金 (TEM)

Fig. 3 Gold nanoparticles prepared by the sodium citrate reduction method

素与抗体双重标记时能够充分结合。同时, 亲和素和抗体双重标记还有助于提高纳米金的稳定性。在相同的离子浓度中未见因修饰后纳米金聚集所引起的颜色变化就说明了这个问题^[27]。

图 4 显示应用亲和素和抗体双重标记纳米金。

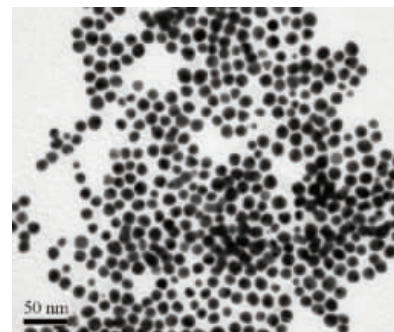


图 4 亲和素抗体双重标记纳米金颗粒 (TEM)

Fig. 4 Gold nanoparticles double-labeled with the avidin and polyclonal antibody

本实验是应用物理法标记亲和素和多抗, 标记后纳米金分散性好。研究表明在 13 nm 左右粒径的每个纳米金可以标记 8 ± 3 个抗体蛋白^[27]。

通过亲和素和多抗标记纳米金的目的是: 一方面通过多抗与通过修饰单抗的磁球捕获富集的待测抗原进行特异的结合, 同时通过亲和素与标记生物素的分子信标相连。在这个过程中, 通过粒径较大的磁球 (2~3 μ m) 捕获富集 IgG 抗原。而后通过与 IgG 抗原不同位点的结合而结合更多粒径远小于磁球的纳米金。每个磁球都会通过标记修饰上的单抗所结合的 IgG 抗原与数十个纳米金相连接; 每个纳米金又可通过修饰亲和素与标记生物素的数十个分子信标相连。通过所连接的纳米金及分子信标数量级的增加而将待测的抗原浓度或含量的信号转化为分子信标与其靶序列杂交后的荧光强度。信号在该过程中逐级扩增, 理论上提高了 2~4 个数量级甚至更高。扩增的倍数主要与磁球、纳米金各自标记修饰的抗体与亲和素等大的蛋白分子的数量有关。本实验标记亲和素时曾做过测定, 每个粒径在约 13 nm 的纳米金可以负载 7~10 个亲和素分子。每个亲和素有 4 个位点可以与生物素结合。由此可见, 主要是通过级联放大的作用使待测抗原的信

息得以指数级扩增。

2.2 AFM 检测结果

通过 AFM 也可知本研究制备的纳米金和修饰后的纳米金形态、分散程度基本均匀(图 5、图 6),有助于实验研究。

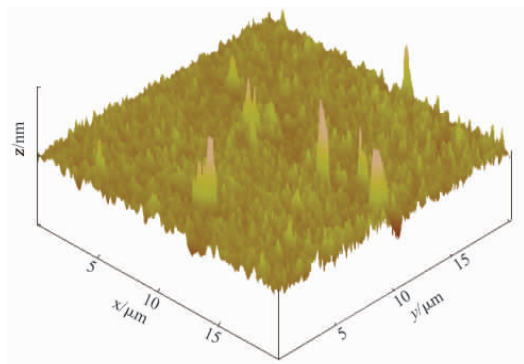


图 5 纳米金颗粒(AFM)

Fig. 5 Gold nanoparticles(AFM)

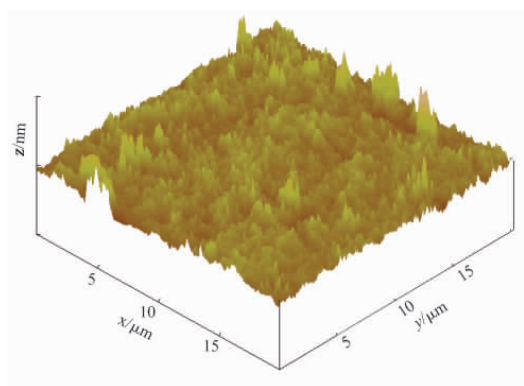


图 6 亲和素抗体双重标记纳米金颗粒(AFM)

Fig. 6 Gold nanoparticles double-labelled with the avidin and multiantibody(AFM)

2.3 荧光分光光度计测定

应用荧光分光光度计测定分子信标与靶序列杂交后的荧光强度,结果见图 7。

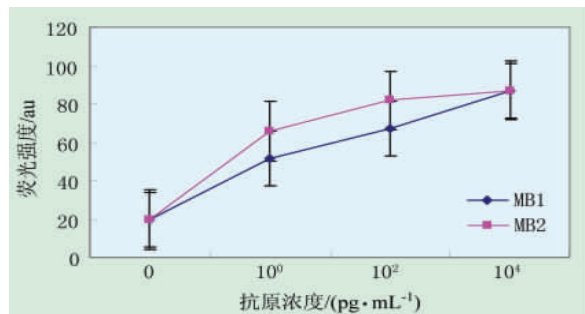


图 7 抗原浓度与荧光强度的关系

Fig. 7 Relationship between the fluorescence intensity and the concentration of antigen IgG

实验结果表明抗原浓度为 0,即无 IgG 抗原时,磁球与纳米金不能相连。反应体系经磁性分离后,修饰 IgG 多抗·亲和素·生物素—S—S—MB 的纳米金不复存在,故加入二硫苏糖醇(DTT)并与足量靶序列杂交,荧光强度值为 19.59 ± 0.599 。实际所测定的荧光值为杂交反应体系缓冲液的背景荧光值。在含 IgG 抗原(3 个浓度任意一个)无靶序列杂交的实验对照组,荧光强度较空白对照组稍高,为 21.06 ± 0.743 ,则为极少量 MB 茎部双链结构自然破坏所发出的荧光。统计学分析各实验组与空白对照和实验对照组比较均有明显差异 ($P < 0.05$)。各实验组杂交后测定荧光强度,结果显示荧光强度值与 IgG 抗原含量呈现出近似线性相关性。

理论上,IgG 抗原含量增高,通过多抗连接的纳米金增多,因而通过纳米金所连接的 MB 数量增多,经 DTT 切割后游离的 MB 也增多。在与足够量的靶序列杂交后,荧光强度也随之增强。实验结果也基本符合,验证了上述理论。本实验检测抗原灵敏度可达到 1 pg/mL ,即 6.67 fM 的水平。

本实验的研究方法比较类似接近于生物条码检测技术。人们一直试图利用该项技术提高检测的灵敏度。已有通过生物条码制备芯片进行蛋白质检测灵敏度接近甚至达到 10^{-18} 的报告^[29]。本实验的着眼点在于利用现有的理论和研究基础,尽可能提高检测的灵敏度,同时也尽可能提高检测的特异性。因此,分子探针技术作为本实验研究的一部分被加以重视与研究。分子信标的检测灵敏度提高有助于本实验研究的 IgG 抗原检测的灵敏度的进一步提高,故分子信标的灵敏度是关键。

设计分子信标要求一般条件下茎部碱基稳定,不易断裂,以免影响与靶序列杂交后的荧光强度。MB 探针的碱基一般在 15~30 对之间;茎部碱基多为 5~7 对,茎部较长可提高其特异性。鸟嘌呤(G)一般不宜连接于 5' 端末端,因其对荧光基团具有淬灭作用,但可将 G 接于 3' 末端。分子信标探针的发夹结构使其特异性高于线性探针的特异性结构^[20]。分子信标的动力学和热力学研究显示,MB 的探针较长则分离常数较低,且特异性降低;但动力学常数常增高。短茎的 MB 的背景信号较长茎的为低,因而对杂交后荧光强度影响较小,但又存在特异性差的缺点。因此,分子信标的设计需从多方面和角度来加以考量^[30]。分子信标信号与背景比值=MB 杂交后荧光强度-缓冲液荧光强度/MB 非杂交荧光强度-缓冲液荧光强度。该值应介于 30~200。

一般情况下,人们设计合成的都是自然状态下的 D-DNA 分子信标,但现研究已经证实 L-DNA 分子信标具有更稳定的结构和探针的选择特异性^[31]。分子信标探针 T_m 值宜在 65°C 以下甚至更低。 T_m 值与茎部的 G(鸟嘌呤)、C(胞嘧啶)含量及长度有关。若 T_m 值过高,与 target sequences 杂交后难以分开,就会影响荧光强度的测定。可通过 Zuker 等^[32]创立的 <http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu>,根据实验要求推测所设计 MB 的 T_m 值及其结构。关于分子信标的淬灭效率,本研究设计的 MB 所用的荧光/淬灭基团——FAM/Dabcyl 的淬灭效率在约 80%^[33]。Dubertret 等曾经将 0.14 nm 的纳米金取代分子信标探针淬灭

集团 Dabcyl, 研究显示其淬灭作用较 Dabcyl 有效率超过 100 倍^[34]。有研究显示通过切口酶信号扩增的方法可更好地提高 MB 检测的灵敏度^[35]。应用量子点 (QD) 取代荧光素会进一步提高荧光检测的效率和灵敏度, 以及可提供 DNA 或 RNA 杂交过程中的多种影像结构用以分析和研究^[36]。分子信标可以与流式细胞术一起应用于原位杂交的检测, 即应用于定位研究^[37]。MB 甚至可应用于细胞内的研究^[38]。应用分子信标还可以进行实时聚合酶链式反应 (PCR) 定量测定^[39]。与应用生物条码技术过程中的银染、比色等方法相比较, 上述实验研究方法较之步骤简便, 就其检测灵敏度而言, 也要高于银染、比色等方法。

3 结论

实验结果充分证实该种检测方法的可行性及灵敏度, 并较研究中常用于核苷酸条码检测技术中的比色、银染等方法简便且有效; 分子信标探针的特异性也使该种检测方法具有良好的特异性。减少实验过程中由于连接、分离效率使得部分扩增信号丢失的问题, 可进一步提高该检测方法的灵敏度。本实验研究的技术方法趋于成熟后可广泛应用于临床医学的辅助检验诊断。

参考文献 (References)

- [1] Mirkin C A, Letsinger R L, Mucic R C. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials [J]. *Nature*, 1996, 382(15): 607-609.
- [2] Hill H D, Mirkin C. The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 324-336.
- [3] Hill H D, Vega R A, Mirkin C A. Nonenzymatic detection of bacterial genomic DNA using the bio bar code assay[J]. *Anal. Chem*, 2007, 79(23): 9218-9223.
- [4] Bao Y P, Wei T, Lefebvre P A, et al. Detection of protein analytes via nanoparticle-based bio bar code technology [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(6): 2055-2059.
- [5] Stoeva S I, Lee J S, Smith J E, et al. Multiplexed detection of protein cancer markers with biobarcoded nanoparticle probes[J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(26): 8378-8379.
- [6] Smith J E, Medley C D, Tang Z, et al. Aptamer-conjugated nanoparticles for the collection and detection of multiple cancer cells [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(8): 3075-3082.
- [7] Adriano A, Castaneda M T, Killard A J, et al. Double-codified gold nanolabels for enhanced immunoanalysis [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(14): 5232-5240.
- [8] Nam J M, Wise A R, Groves J T. Colorimetric bio-barcode amplification assay for cytokines[J]. *Anal Chem*, 2005, 77(21): 6985-6988.
- [9] Huang C, Huang Y, Cao Z, et al. Aptamer-modified gold nanoparticles for colorimetric determination of platelet-derived growth factors and their receptors[J]. *Anal Chem*, 2005, 77(17): 5735-5741.
- [10] Liu J, Lu Y. Adenosine-dependent assembly of aptazyme-functionalized gold nanoparticles and its application as a colorimetric biosensor[J]. *Anal Chem*, 2004, 76(6): 1627-1632.
- [11] Shen L, Chen Z, Li Y, et al. Electrochemical DNA zyme sensor for lead based on amplification of DNA-au bio-bar codes[J]. *Anal Chem*, 2008, 80(16): 6323-6328.
- [12] He P, Shen L, Cao Y, et al. Ultrasensitive electrochemical detection of proteins by amplification of aptamer-nanoparticle bio bar codes[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(21): 8024-8029.
- [13] Zhu D, Tang Y, Xing D, et al. PCR-free quantitative detection of genetically modified organism from raw materials: An electrochemiluminescence-based bio bar code method [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(10): 3566-3571.
- [14] Kubik T, Bogunia-Kubik K, Sugisaka M. Nanotechnology on duty in medical applications[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2005(6): 17-33.
- [15] Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 303-308.
- [16] Sokol D L, Zhang X L, Lu P Z, et al. Real time detection of DNA-RNA hybridization in living cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(20): 11538-11543.
- [17] Matsuo T. Biochem[J]. *Biophys Acta*, 1998, 1379: 178-184.
- [18] Vet J A M, Majithia A R, Marras S A E, et al. Multiplex detection of four pathogeni cretroviruses using molecular beacons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(11): 6394-6399.
- [19] de Baar M P, van Dooren M W, de Rooij E, et al. Single rapid real-time monitored isothermal RNA amplification assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 isolates from groups M, N, and O [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(4): 1378-1384.
- [20] Tyagi S, Bratu D P, Kramer F R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16: 49-53.
- [21] Jordens J Z, Lanham S, Pickett M A, et al. Amplification with molecular beacon primers and reverse line blotting for the detection and typing of human papillomaviruses[J]. *J Virol Methods*, 2000, 89: 29-37.
- [22] van Schie R C, Marras S A E, Conroy J M, et al. Semiautomated clone verification by real-time PCR using molecular beacons [J]. *Biotechniques*, 2000, 29(6): 1296-1308.
- [23] Leone G, Vanschijndel H, Vangemen B, et al. Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26: 2150-2155.
- [24] Abravaya K, Huff J, Marshall R, et al. Molecular beacons as diagnostic tools: technology and applications[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2003, 41(4): 468-474.
- [25] Tsourkas A, Bao G. Shedding light on health and disease using molecular beacons[J]. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 2003, 1(4): 372-384.
- [26] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solution[J]. *Nat Phys Sci*, 1973, 241: 20-22.
- [27] Kong X, Qiao F, Qi H, et al. One-step preparation of antibody and oligonucleotide dual-labeled gold nanoparticle bio-probes and their properties[J]. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 2071-2077.
- [28] Kanaras A G, Wang Z, Bates A D, et al. Towards multistep nanostructure synthesis: programmed enzymatic self-assembly of DNA/gold systems[J]. *Angew Chem Int Ed Eng*, 2003, 42(2): 191-194.



- [29] Goluch E D, Nam J M, Georganopoulou D G, *et al.* A bio-barcode assay for on-chip attomolar-sensitivity protein detection[J]. *Lab Chip*, 2006, 6 (10): 1293-1299.
- [30] Tsourkas A, Behlke M A, Rose S D, *et al.* Hybridization kinetics and thermodynamics of molecular beacons[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(4): 1319-1330.
- [31] Kim Y, Yang C J, Tan W. Superior structure stability and selectivity of hairpin nucleic acid probes with an L-DNA stem [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(21): 7279-7287.
- [32] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3406-3415.
- [33] Marras S A E, Kramer F R, Tyagi S. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(21): e122.
- [34] Antony T, Subramaniam V. Molecular beacons: Nucleic acid hybridization and emerging applications [J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2001, 19(3): 497-504.
- [35] Li J J, Chu Y, Lee B Y H, *et al.* Enzymatic signal amplification of molecular beacons for sensitive DNA detection [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(6): e36.
- [36] Kim J H, Morikis D, Ozkan M. Adaptation of inorganic quantum dots for stable molecular beacons [J]. *Sensors and Actuators B*, 2004, 102: 315-319.
- [27] Lenaerts J, Lappin-Scott H M, Porter J. Improved fluorescent in situ hybridization method for detection of bacteria from activated sludge and river water by using DNA molecular beacons and flow cytometry [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(6):2020-2023.
- [38] Xi C, Balberg M, Boppart S A, *et al.* Use of DNA and peptide nucleic acid molecular beacons for detection and quantification of rRNA in solution and in whole cells[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5673-5678.
- [39] Paillard D, McKain N, Rincon M T, *et al.* Quantification of ruminal clostridium proteoclasticum by real-time PCR using a molecular beacon approach[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103: 1251-1261.

(责任编辑 李慧政)

·学术动态·



“第 6 届国际稀土开发与应 用研讨会”征文

稀土是 21 世纪的战略资源,因其独特的化学和光、电、磁等物理化学性质成为新材料开发领域的重要元素,已广泛应用于国民经济各个领域,是可持续发展不可或缺的重要资源。

中国稀土学会将于 2010 年 8 月在北京举行“第 6 届国际稀土开发与应用研讨会”(ICRE'2010)。现面向所有的从事稀土及其相关科技与工业领域的研究人员征稿,范围如下。

1) 稀土材料及应用:磁学及磁性材料、储氢材料及电池、超磁致伸缩材料、磁致冷、磁光存储材料、光学及荧光材料、高温超导、催化材料、复合材料、生物医用材料等。

2) 稀土化学和物理:配位化学和有机金属化学,生物无机化学,固体化学和物理,物理化学,溶液化学,熔盐化学,电子结构和光谱,分析化学。

3) 稀土在传统领域应用的新进展:稀土在钢铁、有色金属及合金、玻璃陶瓷、催化剂、农业和医药等领域的应用。

4) 稀土资源和冶金:稀土地球化学和选矿,萃取原理和工艺设计方法,分离和湿法冶金,金属及合金的制备,高纯金属及合金的制备,环境保护,生产设备和分析测试仪器。

论文摘要截止日期:2010 年 3 月 31 日;论文全文截止日期:2010 年 8 月 31 日。

网址: <http://www.cs-re.org.cn/icre2010/>; 联系方式:北京市海淀区学院南路 76 号中国稀土学会办公室(100081),陈占恒、韩晓英;电话:010-62182748;传真:010-62188304;电子信箱:icre2010@126.com,csre@cs-re.org.cn。

